

جداسازی اسپرمهای انسانی حامل کروموزوم Y و X به وسیله شیب غلظت Puresperm و ارزیابی آن به روش هیبرید کردن در جا با استفاده از مواد فلورسنت (FISH)

© حمید گورابی Ph.D.*، فاطمه آل احمد B.Sc.**، بهمن زینلی Ph.D.**، سعید کاظمی آشتیانی Ph.D.***،
حسین بهاروند Ph.D.***

* گروه ژنتیک پژوهشکده رویان

** دانشکده زیست‌شناسی پردیس علوم دانشگاه تهران

*** گروه جنین‌شناسی پژوهشکده رویان

**** گروه سلولهای بنیادی پژوهشکده رویان

تاریخ وصول: اسفند ۸۴، تاریخ پذیرش: فروردین ۸۵

چکیده

هدف: ارزیابی شیب غلظت ناپیوسته Puresperm در جداسازی اسپرمهای انسانی براساس کروموزوم جنسی به روش دورگ گیری فلورسانس درجا (FISH) Fluorescent in Situ by Hybridization.

مواد و روشها: نمونه مایع منی از سه نفر با اسپرموگرام طبیعی از مراجعه کنندگان به پژوهشکده رویان انتخاب شد. هر نمونه به دو بخش تقسیم شد، بخشی از آن (کنترل) با با فرسفات شسته شد و بخش دیگر برای عبور از شیب غلظت ۸ لایه‌ای از غلظت ۳۵ درصد تا ۸۴ درصد (با اختلاف ۷ درصد بین لایه‌های متوالی) آماده شد. بعد از سانتیفریوژ اسپرم از بالاترین و پایین‌ترین لایه جدا و بر روی اسلاید تثبیت شده و دو رگ‌گیری در جا با استفاده از پروبهای خاص کروموزومهای X و Y انجام گرفت. پروب به نواحی ماهواره‌ای آلفا بر روی سانترومر کروموزوم X یا Y متصل می‌شود.

بیش از ۱۰۰۰ اسپرم برای هر نمونه شمارش و بر حسب وجود سیگنالهای نارنجی و سبز که به ترتیب معرف اسپرمهای حامل کروموزومهای X و Y است، طبقه‌بندی شدند. درصد اسپرمهای حامل کروموزومهای X و Y در گروه کنترل و نمونه‌های عبور یافته از شیب غلظت Puresperm با آزمون مجذور کای (Chi Square) مقایسه آماری شدند.

یافته‌ها: اختلاف معنی‌داری در نسبت اسپرمهای حامل X و Y بعد از جداسازی در لایه ۸۴ درصد نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد. تفاوت درصد اسپرمهای حامل کروموزوم X و Y در لایه ۳۵ درصد نسبت به لایه ۸۴ درصد و گروه کنترل معنی‌دار بود (به ترتیب $P=0.001$ و $P=0.006$) و درصد اسپرم حامل کروموزوم X در لایه ۸۴ درصد اندکی افزایش یافته بود.

نتیجه‌گیری: اگر چه اسپرمهای حامل کروموزوم Y در لایه ۳۵ درصد به شکل معنی‌داری بیش از کنترل و لایه ۸۴ درصد است اما هنوز نمی‌توان گفت که روش جداسازی اسپرمهای انسانی حامل کروموزوم X و Y توسط شیب غلظت Puresperm روش مناسبی در کلینیک است.

کلید واژه‌ها: کروموزومهای جنسی، اسپرم، FISH، Puresperm

مقدمه

پس از شناسایی نقش کروموزومهای جنسی اسپرم در تعیین جنسیت جنین در سال ۱۹۲۰ [۱]. روشهای مختلفی برای تعیین نوع کروموزوم جنسی اسپرم استفاده شده است. روشهای تعیین جنسیت جنین مانند تشخیص ژنتیکی پیش از لانه‌گزینی ممکن است به سبب محدودیت در تعداد جنینهای با جنسیت مورد نظر به موفقیت نرسند. از آنجائی که بیش از ۵۰۰ نوع بیماری وابسته به جنس شناخته شده است، جداسازی اسپرمهای حامل کروموزومهای X و Y در مواردی که مادر ناقل بیماری است، برای جلوگیری از تولد نوزاد پسر حایز اهمیت است. اولین گزارش مبنی بر افزایش تعداد اسپرمهای حامل کروموزوم Y با استفاده از شیب غلظت آلبومین توسط (Ericsson) اعلام شد [۲].

از دیگر روشها ستون سفادکس^۱ [۳]، گرادیان ناپیوسته پرکل [۴] و روش swim up [۵] را میتوان نام برد. هیچ یک از این روشها برای جداسازی اسپرم حامل کروموزوم X از Y به موفقیت کامل نرسیده‌اند و در حال حاضر فلوسایتومتری به عنوان تنها روش مناسب برای جداسازی اسپرم براساس کروموزومهای جنسی به کار گرفته می‌شود [۶]، هر چند که این روش به علت استفاده از پرتوی لیزری و رنگ فلورسنت می‌تواند مضراتی را در بر داشته باشد. از جمله مشکلات پژوهشهایی که در این زمینه صورت گرفته است، دقت روشهای ارزیابی آنها است که منجر به نتایج ضد و نقیض شده است.

اولین روشی که برای ارزیابی به کار رفته است استفاده از رنگ فلورسنت کوئیناکرین^۲ است که بازوی بلند کروموزوم Y را درخشان می‌کند [۷]. نتایج تحقیقات دال بر غیر اختصاصی بودن و غیر مطمئن بودن این روش به سبب اتصال آن علاوه بر کروموزوم Y به سایر کروموزومها است [۸].

1. Sephadex
2. Quinacrine

پروبه‌های اختصاصی برای کروموزومهای جنسی فرصت مناسبی برای ارزیابی روشهای جداسازی اسپرم فراهم ساخته است. در روش FISH توالی مکمل رشته DNA به‌وسیله مواد فلورسنت نشان دار شده و پس از اتصال به توالی هدف، محل مربوط روی کروموزوم توسط میکروسکوپ فلورسنت قابل مشاهده و شناسایی است. این روش برای مطالعه آنوپلوئیدی و تعیین کروموزوم جنسی در اسپرم می‌تواند استفاده قرارگیرد [۹].

با استفاده از این روش مشخص شد که روشهای گرادیان آلبومین [۱۰]، ستون سفادکس [۳] و Swim up [۱۱] نمی‌توانند نسبت اسپرم حامل X به اسپرم حامل Y را به طور معنی داری تغییر دهند. هر چند شیب غلظت ناپیوسته پرکل را در افزایش اسپرم حامل کروموزوم X با استفاده از روش FISH موثر ارزیابی کرده‌اند؛ با این حال مقدار افزایش آن به حدی نیست که در موارد کلینیکی مورد استفاده قرار گیرد [۱۲]. پرکل به دلیل سمیت از مصارف پزشکی حذف و موادی چون Ixaprep و Puresperm... جایگزین آن شده است [۱۳].

در مطالعه حاضر محلول Puresperm به عنوان ماده ای که در آزمایشگاههای کمک باوروری به منظور شستشوی مایع منی و حذف سلولهای مرده و سایر مواد اضافی از اسپرم استفاده می‌شود، برای جداسازی اسپرمهای حامل کروموزوم X و Y استفاده شده است و نتایج آن با استفاده از روش FISH ارزیابی شد.

مواد و روشها

معیارهای انتخاب نمونه

نمونه‌های مورد استفاده در این تحقیق از بین نمونه‌های مراجعین به پژوهشکده رویان که بر اساس معیارهای سازمان بهداشت جهانی^۳ طبیعی تشخیص داده شده بود، انتخاب شد. انجام تحقیق به وسیله شورای اخلاق پژوهشکده مورد

3. World Health Organization

در بین لایه‌های مختلف توزیع شدند. در انتها نمونه مربوط به بالاترین و پایین‌ترین لایه به آرامی به وسیله پی‌پت پاستور جداسازی شدند.

Puresperm از نمونه بدست آمده از دو لایه، از طریق شستشو با بافر فسفات حذف شد (۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه)، و بر روی رسوب انتهایی لوله که حاوی اسپرم است محلول متانول / اسید استیک به نسبت ۳ به ۱ ریخته شده و یکنواخت می‌گردد و بعد از ۲۰ دقیقه نگهداری در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد سلولهای معلق در محلول بر روی اسلاید تثبیت شدند. سلولها بر روی اسلاید بایستی به نحوی تثبیت گردند که حداکثر تعداد را با عدم همپوشانی داشته باشند تا شمارش سلولها بعد از هیبریداسیون به سهولت انجام شود. اسلایدها تا زمان انجام روش FISH در دمای ۲۰ - درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

مراحل انجام FISH

از تراکم خارج کردن هسته اسپرم^۲

از آنجایی که هسته اسپرم بسیار متراکم است به منظور دسترسی پروب به توالی DNA قبل از انجام مراحل FISH، می‌بایست هسته از تراکم خارج شود. به این منظور اسلایدها به مدت ۵ دقیقه در محلول^۳ Tris 0.1M Hcl (gma,T5941) حاوی^۴ DTT(0.01M) (Sigma,D9779) (PH=8) و سپس در محلول^۵ Tris Hcl 0.1M که حاوی^۶ LIS 0.01M (Sigma,D3635) و^۷ DTT (0.001M) است به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. پس از آن اسلایدها در^۸ SSC (PH=7) 2X شسته شده و به ترتیب در سری اتانول ۷۰ و ۸۵ و ۱۰۰ درصد به مدت ۲ تا ۳ دقیقه آبیگری و در دمای اتاق خشک شدند.

تصویب قرار گرفت و از بیماران رضایت نامه کتبی دریافت شد.

هر نمونه به دو بخش تقسیم شد، نیمی از آن بدون هر گونه تیمار پس از شستشوی اولیه با PBS^۱ برای روش FISH آماده شد و بخش دیگر آن بعد از عبور از شیب غلظت ۸ لایه‌ای Puresperm، از بالاترین و پایین‌ترین لایه (به ترتیب ۳۵ و ۸۴ درصد) جداسازی شده و برای انجام روش FISH استفاده شد.

شیب غلظت ناپیوسته Puresperm

Puresperm محلولی ایزو تونیک است که جهت تخلیص و جداسازی اسپرم انسان قبل از روشهای کمک باروری استفاده می‌شود. به وسیله این محلول اسپرمهای با مورفولوژی طبیعی و تحرک بالا جداسازی می‌شوند همچنین سایر سلولهای اپیتلیالی و گلبولهای سفید و سلولهای نابالغ بدین طریق حذف می‌گردند.

به منظور تهیه شیب غلظت ابتدا محیط کشت Ham's F10 (Sigma,N6635) حاوی ۱۰ درصد سرم آلبومین انسانی (سازمان انتقال خون ایران) آماده و با Puresperm خالص با درصدهای مورد نظر مخلوط شدند. به عنوان مثال برای تهیه لایه با غلظت ۸۴ درصد به ۸۴۰ μl از Puresperm، ۱۶۰ μl محیط کشت سرم دار اضافه شد. به این ترتیب ۸ لایه با غلظتهای ۳۵ تا ۸۴ درصد با اختلاف ۷ درصد بین هر لایه تهیه گردید. در لوله‌ای با انتهای مخروطی (Falcon) یک میلی‌لیتر از هر غلظت از ۸۴٪ تا کمترین غلظت به وسیله پی‌پت پاستور به آرامی اضافه شد و در نهایت ۱ میلی‌لیتر از نمونه اسپرم نیز بر روی بالاترین لایه ریخته شده و با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سلولها در حین سانتریفیوژ براساس چگالی و میزان تحرکشان

2. Nucleuse decondensation
3. Trisma Hydrochloride
4. Dithiothreitol
5. Lithium Diiodosalisilicacid
6. Standard Sodium Citrate

1. Phosphate Buffer Saline

آماده سازی پروب

پرو ب DNA (Qbiogene) استفاده شده در این مطالعه مربوط به نواحی ماهواره‌ای آلفا^۱ بر روی کروموزوم X و Y است. که به وسیله مواد فلورسنت به ترتیب با رنگهای سبز و نارنجی نشان دار شده‌اند.

مقدار $10 \mu\text{l}$ از کوکتل آماده شده از پروبهای X و Y بر روی سطح اسلاید که از قبل مشخص شده ریخته شد و لامل به آرامی بر روی آن قرار داده شده و بعد از پخش شدن کامل پروب برای جلوگیری از تبخیر پروب در هنگام وا سرشت شدن DNA، لبه‌های لامل به وسیله چسب (Rubber cement) کاملاً پوشانده و مسدود گردید.

وا سرشت شدن همزمان^۲ و دو رگ گیری

به منظور تک رشته‌ای شدن DNA در هسته اسپرم و همچنین پروب، اسلایدها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتی گراد بر روی صفحه فلزی حرارتی قرار داده شدند و نهایتاً در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴ تا ۵ ساعت انکوبه شد.

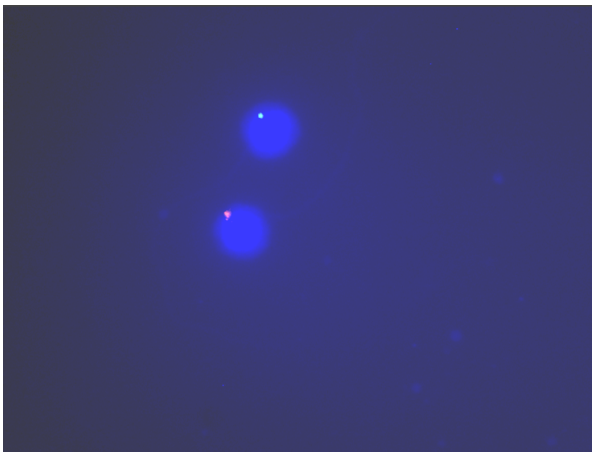
مراحل شستشو بعد از دو رگ گیری

بعد از اتمام زمان هیبریداسیون و برداشتن لامل، اسلاید به آرامی درون محلول حاوی $0.4 \times \text{SSC} / 0.3\% \text{ NP40}$ با دمای ۷۳ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه قرار داده شدند در نهایت به مدت یک دقیقه در محلول حاوی $0.1\% \text{ NP40} / 2 \times \text{SSC}$ در دمای اتاق قرار داده شده و بعد از خشک شدن اسلاید مقدار $7 \mu\text{l}$ محلول - Antifade^۳ DAPI (Aquarius) برای رنگ آمیزی زمینه هسته بر روی آن اضافه شد.

ارزیابی اسلاید و شمارش سیگنال

با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت (Nikon, E800, Japan) مجهز به فیلترهای تک باند و سه باند و نرم افزار Cytovision کروموزومهای X و Y در اسپرم که به صورت نقاط سبز و نارنجی قابل تشخیص هستند، شمارش شدند. به ازای هر نمونه تعداد بیش از ۱۰۰۰ سلول شمارش شد.

هسته سلولهایی شمارش شد که با یکدیگر همپوشانی نداشته و زیاد متورم نبوده و دارای شکل طبیعی و حاشیه مشخص بودند. اسپرم هاپلوئید طبیعی دارای یک سیگنال نشانگر کروموزوم Y یا یک سیگنال نشانگر کروموزوم X است (شکل ۱).



شکل ۱. اسپرم هاپلوئید طبیعی دارای یک سیگنال قرمز (حامل کروموزوم Y) یا یک سیگنال سبز (حامل کروموزوم X)

یافته‌ها

مجموع اسپرم در ۳ نمونه مورد مطالعه شمارش شد. در تمامی موارد بازده دو رگ گیری بیش از ۹۸ درصد بود. نتایج حاصل از شمارش در جدول ۱ خلاصه شده است. درصد اسپرمهای حامل کروموزوم X یا Y در نمونه کنترل با درصد این سلولها در لایه بالا (۳۵ درصد) و لایه پایین (۸۴ درصد) بعد از عبور از شیب غلظت ناپیوسته Puresperm با استفاده از آزمون مجذور کای مقایسه شدند. نسبت بین اسپرمهای حامل کروموزوم X به Y در نمونه‌های کنترل و لایه پایین اختلاف

1. Alpha satellite
2. Co denaturation
3. 4, 6-diamidino-2-phenylindole counter stain

کروموزومها، لقاح مصنوعی و تداوم قدرت باروری اسپرم در محیط آزمایشگاه، رنگ آمیزی اختصاصی DNA و فلوسایتومتری و تفکیک سلولها است. علاوه بر کاربردهایی که تعیین جنسیت قبل از لقاح در علوم دامپزشکی در بهبود کیفیت حیوانات دامی و به دست آوردن جنینهایی با جنسیت مورد نظر دارد، در انسان از کاربردهای اصلی آن به منظور جلوگیری از بیماریهای وابسته به جنس است. در برخی از این روشها جداسازی براساس خصوصیات فیزیکی و حرکتی اسپرم است و دسته‌ای از روشها مبتنی بر تفاوت در کروموزومهای جنسی و خصوصیات هسته در اسپرم‌های حاوی کروموزوم X و Y است.

آیزوکا (Iizukaiz) و همکاران [۱۵] گزارش کردند که سانتریفیوژ اسپرم انسان در شیب غلظت پرکل منجر به افزایش ۹۴ درصدی در اسپرم حامل کروموزوم X می‌شود. آنها از رنگ فلورسنت کوئینا کرین برای ارزیابی اسپرمهای جداسازی شده استفاده کردند. نتایج مطالعات نشان می‌دهد که این نوع رنگ غیر اختصاصی و غیر مطمئن بوده و علاوه بر اتصال به کروموزوم Y به طور غیر اختصاصی به سایر کروموزومهای آتوزوم نیز متصل می‌شود [۸].

ونگ (Wang) و همکارانش [۱۲] بیان کردند که استفاده از گرادیان پرکل منجر به افزایش در اسپرمهای حامل کروموزوم X به مقدار اندک می‌شود. آنها برای ارزیابی نتایج جداسازی از روش FISH استفاده کردند. آنها نسبت اسپرم حامل X به Y در لایه پایین پرکل (لایه ۸۰ درصد) را ۴۴/۱ : ۵۵/۱ بیان کردند. از روشهای دیگری چون واکنش زنجیره ای پلی مرازی^۱ و کاریوتیپ از طریق نفوذ اسپرم به درون تخمکها مستر نیز برای ارزیابی دقت روشهای جداسازی اسپرم حامل X از Y استفاده شده است، که محدودیتهایی دارند [۱۶]. روش FISH به عنوان مطمئن ترین روش برای مطالعه نسبت

معنی داری وجود نداشت (جدول ۲).

درصد اسپرمهای حامل کروموزوم X به Y در لایه بالا نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی داری مشاهده شد (P=0.006) که به صورت اندک افزایش در اسپرم حامل کروموزوم Y در لایه بالا است.

همچنین نسبت X به Y بعد از عبور از شیب غلظت ناپیوسته Puresperm در لایه بالا نسبت به لایه پایین اختلاف معنی داری مشاهده شد (P=0.001) که به صورت افزایش اندک در تعداد اسپرمهای حامل X در لایه پایین و افزایش اسپرمهای حامل Y در لایه بالا است.

جدول ۱. درصد اسپرمهای حامل کروموزوم X و Y در مایع منی قبل و بعد از جداسازی با شیب ناپیوسته Puresperm، ارزیابی شده به وسیله روش FISH

گروه	تعداد کل اسپرم شمارش شده	تعداد اسپرم با کروموزوم Y (درصد)	تعداد اسپرم با کروموزوم X (درصد)
کنترل	۹۹۱۶	۴۸۴۳ (۴۸/۸۴)	۵۰۷۳ (۵۱/۱۵)
لایه پایین	۶۷۱۱	۳۲۲۶ (۴۸/۰۷)	۳۴۸۵ (۵۱/۹)
لایه بالا	۷۸۲۲	۳۹۸۳ (۵۰/۹)	۳۸۳۹ (۴۹/۰۷)

جدول ۲. نتایج مربوط به مقایسه نسبت X:Y در نمونه کنترل با لایه بالا و پایین شیب غلظت

نسبت	مقدار P	سطح معنی داری
کنترل / لایه بالا	۰/۰۰۶	معنی دار
کنترل / لایه پایین	۰/۳۳	بی معنی
لایه بالا / لایه پایین	۰/۰۰۱	معنی دار

بحث

بعد از شناسایی کروموزومهای X و Y در اسپرم [۱] روشهای جداسازی اسپرم حامل کروموزوم X از اسپرم حامل کروموزوم Y حاصل پیشرفت در زمینه‌های کاریوتیپ

1. Polymerase Chain Reaction

جنسی و آنپلوئیدی در اسپرم انسانی است [۱۷]. در مطالعه حاضر از شیب غلظت ناپیوسته ۸ لایه‌ای Puresperm که محلولی برای آماده سازی اسپرم در آزمایشگاه کمک باروری است استفاده شد. برای تعیین درصد اسپرمهای حامل X و Y بعد از جداسازی، در بالاترین و پایین ترین لایه از روش FISH و پروبهای خاص کروموزوم X و Y استفاده شد. بین نسبت X به Y در نمونه کنترل نسبت به لایه پایین تفاوت معنی دار مشاهده نشد، اما در نمونه کنترل در مقایسه با لایه بالایی تفاوت معنی دار از این نظر وجود داشت. همچنین نسبت بین اسپرمهای حامل X به Y در لایه بالا نسبت به لایه پایین نیز تفاوت معنی دار همراه با افزایش تعداد اسپرمهای حامل کروموزوم X داشت. هر چند این اختلاف به اندازه ۹۴ درصد افزایش اسپرم حامل X در لایه پایین در شیب غلظت پرکل که توسط آیزوکا گزارش شد، نیست. البته به علت استفاده از کوئیناکرین برای ارزیابی نتایج و غیراختصاصی بودن این روش نتایج آنها قابل استناد نیست [۱۴].

از طرفی بیان شده است که احتمالاً پرکل در عملکرد رنگ کوئیناکرین تداخل ایجاد کرده و منجر به افزایش کاذب در تعداد اسپرم حامل کروموزوم X می شود [۸]. با استفاده از PCR کمی^۱ لبل (Lobel) و همکارانش تفاوتی در نسبت جنسی اسپرمها مشاهده نکردند. با این حال از جمله محدودیتهای این روش عدم تمایز بین اسپرمهای دیپلوئید ازهاپلوئید است [۱۷].

مشابه ونگ (Wang) و همکاران توھیاما (Tohyama) و همکارانش با استفاده از روش FISH نشان دادند که نسبت اسپرم حامل کروموزوم X در لایه ۸۰ درصد از گرادیان ناپیوسته ۱۲ لایه ای پرکل افزایش یافته است [۱۸]. هر چند میزان این افزایش به حدی نیست که برای تشخیص پیش از

لقاح به کار گرفته شود. لین (Lin) و همکاران نیز نظر مشابهی را بیان کردند. به علاوه آنها عنوان کردند که احتمالاً بعد از سانتریفیوژ با پرکل اسپرم حامل X و Y توانایی باروری متفاوتی خواهند یافت و پرکل کاهش قدرت باروری اسپرم حامل کروموزوم Y را سبب می شود. همچنین تخمکهایی که با اسپرمهای حامل X یا Y لقاح می یابد از نظر تکوین و لانه گزینی می توانند متفاوت باشند [۱۹]. مطالعات متعددی بیان می کند که جنینهایی که سریعتر به تسهیم می رسند اغلب جنسیت مذکر دارند [۲۰].

اسامو (Osamu) و همکاران بیان کردند که جداسازی اسپرمهای پر تحرک با استفاده از روش swim-up و شیب غلظت پرکل تغییری در نسبت اسپرمهای حامل X و Y ایجاد نمی کند به علاوه با استفاده از روش FISH و با استفاده از ۳ پروب مربوط به کروموزومهای جنسی و کروموزوم آتوزوم نشان دادند که شیب پرکل ۲ لایه ای اسپرمهای حامل کروموزوم X را در حد کم افزایش می دهد و به علاوه اسپرمهای حامل X و Y را در گروه با تحرک بالا و اسپرمهای با تحرک کم مقایسه کردند. $83\% \pm 50$ اسپرم حامل کروموزوم X در لایه پایین که پرتحرک هستند در مقایسه با $49\% \pm 49/3$ در گروه کنترل [۲۱].

در نتایج تحقیق حاضر نیز مانند تحقیق فوق تفاوتی در اسپرمهای حامل کروموزوم X و Y در لایه پایین نسبت به کنترل مشاهده نشد.

همچنین فلاهرتی (Flaherty) بیان کرد که آلبومین نمی تواند اسپرمها را بر اساس کروموزومهای جنسی جدا کند هر چند ونگ (Wang) و همکارانش اندکی افزایش در تعداد اسپرمهای حامل کروموزوم X را با این روش گزارش کرده بودند [۱۰ و ۱۲].

در مطالعه حاضر بین لایه های بالا و پایین شیب غلظت افزایش معنی داری در اسپرمهای حامل کروموزوم X مشاهده شد. مکانیسم جداسازی اسپرمهای حامل X و Y توسط شیب غلظت ناپیوسته دقیقاً مشخص نیست. کانکو (Kaneko) و

1. Quantitative PCR

اسپرمهای حامل X در لایه پایینی شیب غلظت Puresperm را نیز میتوان به مکانیسم مشابهی نسبت داد. با این حال نیاز به تحقیقات بیشتر در این زمینه است.

تقدیر و تشکر

این مطالعه طرح تحقیقاتی مصوب پژوهشکده رویان با شماره ۲-۲۴۱ است. بدین وسیله از کلیه مسئولین و پرسنل محترم پژوهشکده رویان که زمینه اجرای این تحقیق را فراهم آوردند کمال تشکر و قدردانی را داریم.

References

1. **Painter TS.** Study in mammalian spermatogenesis 2 .The spermatogenesis of man. J Exp Zool 1923; 37:291-321.
2. **Ericsson RJ, Langevin CN, Nishino M.** Isolation of fractions rich in Y spermatozoa . Nature 1973; 246: 421-4.
3. **Vidal F, Morgas M, Catala V, Torello M.J.** Sephadex filtration and human serum albumin gradients do not select spermatozoa by sex chromosome: a fluorescent in-situ hybridization study. Hum Reprod 1993; 8:1740-43.
4. **Kaneko S, Oshio S, Kobanawa K, Kobayashi T.** Purification of human sperm by a discontinuous percoll density gradient with an inner column . Biol. O. Reprod. 1986;35:1059-63 .
5. **Check JH, Katsoff D.** A prospective study to evaluate the efficacy of modified swim-up preparation for male sex selection. Hum. Reprod 1993; 8 :211-4.
6. **Johnson LA, Welch GR, KeyVanfar K.** Gender pre selection in humans? Flow cytometric separation of X & Y sperm

همکاران پیشنهاد کردند که جداسازی اسپرم توسط پرکل براساس تفاوت در سرعت رسوب اسپرم است که می تواند تحت تاثیر اندازه سر اسپرم و تحرک آن باشد [۴]. هر چند واتکینز (Watkins) و همکاران تفاوتی در اندازه قطر سر اسپرم در لایه بالا و پایین مشاهده نکردند [۲۲].

از طرفی با استفاده از فلوسیتومتری، نشان داده شده است که اسپرمهای حامل کروموزوم X در گاو دارای حرکت سریعتر از اسپرم حامل کروموزوم Y است [۲۳] و با استناد به این نظریات کوبایاشی (Kobayashi) و همکاران بیان کردند که تفاوت در تحرک اسپرمهای حامل کروموزوم X و Y روی سرعت رسوب آنها تاثیر گذاشته و جداسازی با استفاده از پرکل را بر این اساس دانسته اند [۲۴].

بر اساس گزارشهایی که اسپرم حامل X را دارای سر بزرگتر از Y می دانستند [۱۴]، محققان علت افزایش اسپرمهای حامل کروموزوم X را چنین توجیه می کنند که چون اندازه سر بیشتر از چگالی بر جداسازی اسپرم به وسیله شیب پرکل نقش دارد، بنابراین اسپرم حامل X با سر بزرگتر و وزن بیشتر سریعتر رسوب می کند [۱۳] با این حال نتایج امجد (Amjad) و همکارانش و همچنین زالتن (Zaltan) و همکارانش نشان داد که تفاوتی در اندازه سر اسپرم حامل کروموزومهای X یا Y وجود ندارد [۲۵ و ۲۶].

هر چند اریکسون (Ericsson) و همکاران افزایش اسپرمهای حامل Y را با استفاده از آلبومین بیان کردند [۲] اما تحقیقات مشابه خلاف این را نشان دادند و آنها معتقدند نیاز به بررسی و آزمایشهای بیشتری در این زمینه است و این احتمال را دادند که با استفاده از آلبومین، اسپرمهای حامل کروموزوم Y بیشتر از اسپرم حامل کروموزوم X غیرفعال می شوند [۲۷].

به علاوه سطح اسپرم حامل X را دارای بار منفی بیشتری می دانند [۲۸] و این احتمال را می دهند که برهمکنش بین سطح اسپرم و محیط جداسازی می تواند بر جداسازی اسپرمهای حاوی X از Y با استفاده از شیب ناپیوسته پرکل نقش داشته باشد. احتمالاً افزایش معنی دار مشاهده شده در

- Reprod 1993; 8: 1733-9.
7. **Pearson PL, Bobrow M.** Fluorescent staining of the Y chromosome in mitotic stages of the human male. *J Reprod Fertil* 1970; 22:177-9.
 8. **Van Kooij RJ, Van Oost BA.** Determination of sex ratio of spermatozoa with a deoxyribonucleic acid-probe & quinacaine staining: a comparison, *Fertil. Steril* 1992; 58: 384-6.
 9. **Guttenbach M, Wolfgang E, Schmid M.** Analysis of structural and numerical chromosome abnormalities in sperm of normal men and carriers of constitutional chromosome aberrations. *Hum Genet* 1997; 100 :1-21.
 10. **Flaherty SP, Michalowska J, Swann NJ, Dmowski WP, Matthews CD, AitkenRJ.** Albumin gradients do not enrich Y-bearing human spermatozoa *Hum Reprod* 1997; 12: 938-42.
 11. **Han TL, Flaherty SP, Food JH, Matthews CD.** Detection of X & Y bearing human spermatozoa following motile sperm isolation by swim-up, *Fert Steril* 1993; 60: 1046-51.
 12. **Wang HX, Flaherty SP, Mathews CD, Swann NJ.** Discontinuous percoll gradient enrich X-bearing human spermatozoa: a study using double – label FISH. *Hum Reprod* 1994; 9: 1265-70.
 13. **Svalander P.C., Lundin K., Holmes P.V** Endotoxin level in percoll density gradient media used to prepare sperm for human IVF treatment, *Hum Reprod* 1995; 10 (abstract for the prevention of X-linked disease. *Hum book 2*): 130.
 14. **Cui KH.** Size differences between human X and Y spermatozoa and prefertilization diagnosis. *Mol Hum Reprod* 1997; 13: 61-7.
 15. **Iizukaiz R, Kaneko S, Aoki R, Kobayashi T** Sexing of human sperm by discontinuous percoll density gradient & its clinical application. *Hum Reprod* 1987; 2:573-5.
 16. **Lobel SM, Pomponio RJ, Mutter GI.** The sex ratio of normal and manipulated human sperm quantitated by the polymerase chain reaction. *Fertil Steril* 1993; 59:387-92.
 17. **Flaherty SP, Mathews CD.** Application of modern molecular techniques to evaluate sperm sex selection methods. *Mol. Hum Reprod* 1996; 2: 937-42.
 18. **Tohyama Y, Oshio S, Yotsukura M, Umeda T, Mohri H.** Percoll density gradients centrifugation can separate human X-bearing sperm. *J Assist Reprod. Genet* 1997; 14 (Suppl):194s.
 19. **Lin SP, Lee RK, Tsai YJ, Hwa YM, Lhn MH.** Separating X-bearing human spermatozoa through a discontinuous Percoll density gradient proved to be inefficient by double-label fluorescent in situ hybridization. *J Assist Reprod Genet.* 1998; 15: 565-9.
 20. **Milki AA, Jun SH, Hinckley M.D, Westphal L.W.** Comparison of the sex ratio with blastocyst transfer and cleavage stage transfer. *J Assist Reprod Genet* 2003; 20(8):323-6.
 21. **Osamu S, Miharu N, Okamoto E, Ohama K.** Assessment of sex chromosome ratio and

- aneuploidy rate in motile spermatozoa selected by three different methods Hum Reprod 1997; 12: 2437-42.
22. **Watkins AM, Chan PJ, Patton WC.** Sperm kinetics and morphology before and after fractionation on discontinuous Percoll gradient for sex preselection: computerized analyses. Arch Androl 1996; 37(1):1-5.
23. **Penfold LM, Holt C, Holt WV, Welch CR, Cran DG, Johnson LA.** Comparative motility of X and Y chromosome bearing bovine sperm separated on the basis of DNA content by flow sorting . Mol Rep Dev 1998; 50 :323-7.
24. **Kobayashi J, Histoshi O, Hiroshi U, Tetsuya K.** Assesment of bovine X and Y bearing spermatozoa in fractions by discontinuos percoll gradient with rapid FISH. J O Reprod Dev 2004; 50:463-9.
25. **Amjad MH, Sailen B, Pandurancg kulkarni M.** Lack of significant morphological differences between human X and Y spermatozoa and their precursor cells (spermatid) exposed to different prehybridization treatment. J O Androl 2001; 22: 119-23.
26. **Zaltan Z, Celik Ozenci C, Ovari L, Jakab A, Sati JL, Ward DC, Huszar G.** Dimensional assessment of X-bearing and Y-bearing haploid and disomic human sperm with the use of fluorescence in situ hybridization and objective morphometry. Fertil Steril 2006; 85:121-7.
27. **Rose GA, Wong A.** Experiences in Hong Kong with the though & practice of the albumin column method of sperm separation for set selection. Hum Reprod 1998; 13: 146-9.
28. **Kaneko S, Oshio S, Kobayashi T, Lizuka R.** (1984) Human X and Y bearing sperm differ in cell surface sialic acid content. Biochem Biophys Res Commun 1984; 124 : 950-5.